草鱼乙酰辅酶A羧化酶β基因全长cDNA分子克隆与表达分析

严　媛　程汉良*　许建和　韩　振　易乐飞　申　欣　丁祝进
（淮海工学院，海洋生命与水产学院，连云港 222005）

摘　要：本试验采用反转录PCR(RT-PCR)和cDNA末端快速扩增（RACE）技术克隆获得草鱼乙酰辅酶A羧化酶β（*ACC2*）基因全长cDNA，并采用实时荧光定量PCR技术研究*ACC2*基因在肝胰脏、脾脏、大脑、前肠、中肠、后肠、肾脏、肌肉、心脏和肠系膜脂肪等组织中的表达，同时，还对饲喂不同脂肪源饲料12周后草鱼肝胰脏和肌肉中以及饥饿再次投喂后3、6、12和24 h肝胰脏中*ACC2* mRNA的表达变化进行了研究。结果显示：草鱼*ACC2*基因cDNA全长7 533 bp，含1个7 149 bp的开放阅读框，编码2 382个氨基酸，ACC2蛋白计算分子质量为268.34 ku，等电点为6.13。草鱼*ACC2*基因存在可变剪接，形成另外1个同工型（isoforms），比分子质量为268.34 ku的ACC2蛋白少8个氨基酸。*ACC2*基因在所有检测组织中均有表达，*ACC2* mRNA的相对表达量在肌肉中最高，为29.13，在肝胰脏中最低，仅为1.90。肌肉中*ACC2* mRNA的相对表达量与大脑、前肠和心脏差异不显著（$P>0.05$），但显著高于其他组织（$P<0.05$）。投喂不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏及肌肉中*ACC2* mRNA相对表达量无显著影响（$P>0.05$）；饥饿再投喂后草鱼肝胰脏中*ACC2* mRNA相对表达量在12 h达到高峰值，为6.17，之后明显下降，24 h时仅为2.84。本试验成功克隆了草鱼*ACC2*基因全长cDNA，其主要的功能位点ATP结合位点、生物素结合位点与其他脊椎动物相比基本保守。草鱼*ACC2*基因主要在肌肉等脂肪分解活跃的组织中表达，投喂不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏中*ACC2* mRNA的相对表达量无显著影响；饥饿再投喂后，肝胰脏中*ACC2* mRNA的相对表达量在投喂12 h后最高。

关键词：草鱼；乙酰辅酶A羧化酶β；分子克隆；基因表达

中图分类号：Q785;Q786　　文献标识码：A　　文章编号：

乙酰辅酶A羧化酶（acetyl-CoA carboxylase,ACC）是脂肪酸合成的限速酶，它以生物素为辅酶，催化乙酰辅酶A生成丙二酸单酰辅酶A（malonyl CoA,MA），为脂肪酸的合成提供底物[1-2]。原核生物ACC由3个基因编码的亚基组成，它们分别是生物素羧化酶（biotin carboxylase,BC）、生物素羧基载体蛋白（biotin carboxyl carrier protein,BCCP）和羧基转移酶（Carboxyltransferase,CT），真核生物ACC由1个基因编码，并同时具有上述3个结构域[3]。目前ACC有2种亚型，即ACC1（或ACCα）和ACC2（或ACCβ），分别由*ACACA*和*ACACB*基因编码。*ACC* 2种亚型的组织分布不同，*ACC1*主要在脂肪生成活跃的组织如肝脏、脂肪和乳腺中表达，为脂肪酸合成提供原料，而*ACC2*主要在脂肪分解活跃的组织如肌肉和心脏中表达，通过调节肉碱棕榈酰转移酶-I（carnitine palmitoyltransferase-Ⅰ,CPT-Ⅰ）发挥生物学功能[4]。在恒温动物中，已经克隆出鼠[5]、牛[6]等*ACC1*基因和人[7]*ACC2*基因的全长cDNA，人的*ACC2*基因含一个长度为7 449 bp

收稿日期：2017-10-23
基金项目：国家自然科学基金（31272636）；江苏省自然科学基金（BK2012664）；江苏省优势学科建设工程项目（PAPD）
作者简介：严　媛（1985—），女，江苏宿迁人，硕士研究生，研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 15952761160@163.com
*通信作者：程汉良，教授，硕士生导师，E-mail: CHL3139@163.com

的开放阅读框，编码 2 483 个氨基酸，定位在染色体 12q23 上[7]。ACC2 与 ACC1 的氨基酸序列的相似性高达 75%，两者的主要区别在 N 端，哺乳动物的 ACC2 比 ACC1 多约 140 个氨基酸[8-9]，多出区域主要作用是将 ACC2 定位在线粒体外膜上。关于鱼类 *ACC* 基因的研究较少，目前已经克隆出草鱼（*Ctenopharyngodon idella*）*ACC*1 基因全长 cDNA 序列[10]。

草鱼属鲤形目鲤科，因其生长迅速、肉味鲜美、饲料来源广和经济效益好而成为我国优良养殖鱼类。由于规模化养殖的不断扩大，鱼类出现肝脂质过度蓄积，所引起的代谢紊乱等问题也日趋严重。随着分子生物学技术的快速发展，从分子层面上探究营养调控的机理是营养学研究的新趋势。本试验拟克隆草鱼 *ACC*2 基因全长 cDNA 序列，分析其在不同组织中表达情况，研究饲喂不同脂肪源饲料后草鱼肌肉和肝胰脏中及饥饿再投喂后草鱼肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的表达变化，探讨该基因在草鱼脂肪代谢调控中的作用，为优化草鱼饲料配方提供参考，同时为解决养殖鱼类营养性脂肪肝等问题提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 草鱼 *ACC*2 基因全长 cDNA 分子克隆

1.1.1 试验用鱼

试验用鱼购自连云港市赣榆区欢墩渔场，规格为（56.4±1.8） g/尾。

1.1.2 试验引物

本试验所用引物见表 1。本试验共设计了 3 对 *ACC*2 实时荧光定量 PCR 引物，候选内参基因β-肌动蛋白（*ACTB*）、*eEF1A*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GAPDH*）1、*GAPDH*2、*RPL*13*A* 和 *TUBB*2 分别设计 2 对引物，筛选扩增效率在 0.90～1.05 之间的引物为最终定量引物。

表 1 试验所用引物序列及预期产物大小

Table 1 Primer sequences and expected product sizes for the experiment

引物名称 Primer names	序列 5'→3' Sequence（5'→3'）	用途 Use	预期产物大小/bp Expected product size/bp
反转录 PCR 引物 Reverse transcription PCR primers			
ACC$_2$-F$_1$	AGTTTGTCACTCGCTTTGGA	反转录 PCR 扩增核心序列 1	942
ACC$_2$-R$_1$	CACTCACATAGCCCACCATT		
ACC$_2$-F$_2$	AATGGTGGGCTATGTGAGT	反转录 PCR 扩增核心序列 2	1 189
ACC$_2$-R$_2$	GCAGAGGGTGACCTGAGTA		
ACC$_2$-F$_3$	ACCAGGAACCGTATTAGAG	反转录 PCR 扩增核心序列 3	1 072
ACC$_2$-R$_3$	TAAGGCAGCCATACAAAC		
ACC$_2$-F$_4$	ACCGTAGTGGAGTTAGAGGC	*ACC*2 多态性的识别	1 239～1 269
ACC$_2$-R$_4$	GAGCAGCACCCAAGTAGAG		
ACC$_2$-F$_5$	AAGACMGAATYTACMGWAACCT	反转录 PCR 扩增核心序列 5	409
ACC$_2$-R$_5$	CGACTRCCRTAKCGCATC		
ACC$_2$-F$_6$	ACCCTTCAAAGATAGAGGAGTC	反转录 PCR 扩增核心序列 6	806
ACC$_2$-R$_6$	GCRGGTGTAGTCYTGAGGHG		
ACC$_2$-F$_7$	TTACGGGCATCTGAGTTA	反转录 PCR 扩增核心序列 7	1 088
ACC$_2$-R$_7$	ACTTVAGCAYCTGRTCRTA		
ACC$_2$-F$_8$	ACAGTTGAGGTTGCCATTC	反转录 PCR 扩增核心序列 8	832
ACC$_2$-R$_8$	CYRCTTKGTTATTRTCCC		

3′、5′cDNA 末端快速扩增引物 3′、5′RACE primers			
Oligo(dT)$_{16}$AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)$_{16}$	3′RACE 反转录合成第 1 链	—
AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	与 AC-F$_1$ 或 AC-R$_2$ 合用	—
Race$_3$-R	CTAGAGGTACCGGATCCTT	与 AC-F$_2$ 合用	—
AC-F$_1$	GGAGCGTAAAGACTTGGAG	与 AP 合用 3′RACE 第 1 轮	—
AC-F$_2$	GTTTGCGGCGACTGCTGTT	与 Race$_3$-R 合用 3′RACE 巢式 PCR	554
AC-R	TCGCTAGTCCCTCGTCCACATC	5′RACE 反转录合成第 1 链	—
AC-R$_1$	TCATCTCAACATTGGCATAG	与 Oligo(dT)$_{16}$AP 合用 5′RACE 第 1 轮	596
AC-R$_2$	CGGAACATTTCATACGACCAG	与 AP 合用 5′RACE 巢式 PCR	
实时荧光定量 PCR 引物 RT-qPCR primers			
qACC$_2$-F$_3$	TCTACTTGGGTGCTGCTCG	*ACC2* 实时荧光定量 PCR	92
qACC$_2$-R$_3$	TGATGAGGTCAGAATGGCG		
qeEF1A-F$_3$	CGCCAGTGTTGCCTTCGT	内参基因 *qeEF1A* 实时荧光定量 PCR	98
qeEF1A-R$_3$	CGCTCAATCTTCCATCCCTT		
qACTB-F$_3$	GATGATGAAATTGCCGCACTG	内参基因 *ACTB* 实时荧光定量 PCR	135
qACTB-R$_3$	ACCGACCATGACGCCCTGATGT		
qGAPDH1-F$_1$	CCAAGTGTCAGGACGAACAGAGG	内参基因 *GAPDH* 实时荧光定量 PCR	—
qGAPDH1-R$_1$	TGCGACCGAATCCGTTGATACC		
qGAPDH2-F$_2$	CAAGGCTGTGGGCAAAGTCATTCC	内参基因 *GAPDH* 实时荧光定量 PCR	105
qGAPDH2-R$_2$	GAGGCGGCAGGTGAGGTCAAC		
qRPL13A-F	CTTCTGGAGGACAGTAAGAGGTAT	内参基因 *RPL13A* 实时荧光定量 PCR	—
qRPL13A-R	GGAGGAGGGATGCCATCAAAGAC		

1.1.3 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链的合成

取 6 尾喂食后 6 h 的草鱼活体解剖，快速分离肝胰脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠、肠系膜脂肪、大脑、白肌和心脏，液氮研磨，采用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒（RNeasy Lipid Tissue Mini Kit）按推荐的方法提取各个组织的总 RNA，1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，核酸蛋白定量仪测定 RNA 的浓度。采用 QIAGEN 反转录试剂盒，以 Oligo(dT)$_{16}$AP 为引物，按推荐的方法去除 DNA 污染并反转录合成 cDNA 第 1 链。

1.1.4 *ACC2* 基因 cDNA 的克隆

根据斑马鱼（*Danio rerio*）（XM_009301377）和草鱼已扩增序列，设计 4 对简并引物和 4 对特异性引物，PCR 扩增 *ACC2* 基因 8 段核心序列，25 μL 反应体系如下：TaKaRa 公司的 Sapphire Amp Fast PCR Master Mix 12.5 μL，肝胰脏和心脏 2 种组织混合 cDNA 第 1 链 1 μL，上、下游引物各 0.5 μL，双蒸水（ddH_2O）10.5 μL。扩增条件为：94 ℃变性 40 s、52 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环，反应前 95 ℃预变性 3 min，反应后 72 ℃充分延伸 7 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收，克隆测序。

1.1.5 草鱼 *ACC2* 基因 3′和 5'cDNA 末端快速扩增（RACE）

根据 *ACC2* 基因核心序列设计 3′和 5′RACE 特异性引物（表 1）。按照 Cheng 等[10]的方法克隆 3′和 5′末端序列。

1.1.6 序列分析

用 DNAstar 7.1 软件包中 SeqMan 软件将核心序列及 3′和 5′末端序列进行组装，得到 *ACC2* 基因全长 cDNA 序列。用 EditSeq 对序列进行编辑和分析，寻找开放阅读框，并翻译成氨基酸序列。通过

http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/预测信号肽，通过 http://smart.embl-heidelberg.de/分析蛋白质的结构域。

1.2　草鱼 *ACC*2 基因组织表达

试验用鱼购自连云港市赣榆区欢墩渔场，规格为（56.4±1.8） g/尾。取 6 尾草鱼活体解剖，快速分离肝胰脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠、肠系膜脂肪、大脑、白肌和心脏，液氮研磨，提取各个组织的总RNA，以随机引物按推荐的方法去除 DNA 污染并反转录合成 cDNA 第 1 链，采用 SYBR Green RT-qPCR 方法，反应在 Step One Plus PCR 仪（ABI）上进行。采用 QIAGEN 的 QuantiNova SYBR Green PCR Kit 定量试剂盒，每个样品设置 3 个重复，候选内参基因分别为 *ACTB*、*eEF*1*A*、*GAPDH*1、*GAPDH*2、*RPL*13*A* 和 *TUBB*2，利用软件 GenEx 6.0.1 中 geNorm 算法筛选内参基因，对草鱼 *ACC*2 基因组织表达进行定量分析。

1.3　不同脂肪源的饲料对草鱼 *ACC*2 基因表达的影响

1.3.1　试验饲料

试验共设 3 组，3 组饲料的脂肪源分别为 5%鱼油（鱼油组）、5%猪油（猪油组）和 5%豆油（豆油组），饲料中其他组分完全相同（表 2）。制作饲料的鱼粉、鱼油和预混料等主要原料由岳泰集团提供。称量各种原料，充分混匀 10 min，每千克原料加水 500 mL，揉拌 15 min，利用便携式绞肉机进行制粒，放入干燥箱内 55 ℃烘 3 h，室温放置 1 h，装袋密封保存，编号，待用。

表 2　试验饲料组成及营养水平（干物质基础）

Table 2　Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis)　%

项目 Items	组别 Groups		
	鱼油 Fish oil	猪油 Lard oil	豆油 Soybean oil
原料 Ingredients			
进口鱼粉 Imported fish meal	15.0	15.0	15.0
豆粕 Soybean meal	24.0	24.0	24.0
菜籽粕 Cottonseed meal	24.7	24.7	24.7
血粉 Blood powder	3.0	3.0	3.0
次粉 Wheat middling	25.0	25.0	25.0
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.8	1.8	1.8
L-赖氨酸 *L*-Lys	0.12	0.12	0.12
DL-蛋氨酸 *DL*-Met	0.08	0.08	0.08
胆碱 Choline	0.3	0.3	0.3
鱼油 Fish oil	5.0		
猪油 Lard oil		5.0	
豆油 Soybean oil			5.0
预混料 Premix1)	1.0	1.0	1.0
合计 Total	100.0	100.0	100.0
营养水平 Nutrient levels2)			
粗蛋白质 Crude protein	35.0	35.0	35.0
粗脂肪 Crude fat	6.1	6.1	6.1

1)预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of diets:VA 5 000 IU,VD 2 000 IU,VK 5mg,VE 50 mg,VB_1 8 mg,VB_2 10 mg,VB_{12} 0.03 mg,VB_6 8 mg,泛酸 pantothenic acid 30 mg,烟酸 nicotinic acid 30 mg,叶酸 folic acid 3 mg,生物素 biotin 0.4 mg,VC 180 mg,肌醇 inositol 100 mg,Mg 300 mg,Cu 4 mg，Fe 170 mg,Zn 150 mg,Mn 22 mg,I 1 mg,Co 0.25 mg,Se 0.4 mg。

2)计算值 Calculated values。

1.3.2　饲养管理

饲养试验在单循环可控试验生态水槽系统的 9 个水缸内完成，每个水缸体积 240 L。试验用鱼购自连云港市赣榆区欢墩渔场，共 180 尾，规格为（56.4±1.8） g/尾，随机分为 3 组，每组 3 个重复，每个水缸 20 尾，养殖周期 12 周，养殖水温 25～28 ℃。放养后用商品饲料喂养 1 周，驯化草鱼上浮抢食，然后逐步换用试验饲料。试验期间，每天 08:00、11:00、14:00 和 17:00 各投饲 1 次，初期根据试验鱼的初始体重，按 2%的日投饵率确定日投饵量为 25 g/缸，如当日各缸饲料有剩余，称重扣除，根据各缸草鱼的吃食情况及时调整投饵量，每天草鱼的采食量和采食情况及时记录，后期日投饵量增加到 35 g/缸。

1.3.3 不同脂肪源饲料对草鱼 *ACC*2 基因表达的影响

饲养试验结束后，统计各组剩余鱼尾数，逐尾称重。每缸取 3 尾，每个组共取 9 尾解剖，取内脏称重，计算脏体比，取肝胰脏和肌肉提取总 RNA，用于 *ACC*2 基因表达定量研究。

1.3.4 饥饿再投喂对草鱼 *ACC*2 基因表达的影响

饲养试验结束后，禁食 24 h 后再次投喂，分别在投喂后 3、6、12 和 24 h 时每缸取 3 尾，每个组共取 9 尾解剖，取肝胰脏，用于总 RNA 提取和 *ACC*2 基因表达定量研究。

1.3.5 相关指标计算公式

净增重率（%）=100×(试验末鱼体均重-试验初鱼体均重)/试验初鱼体均重；

饲料系数=每个缸投喂饲料总量/每个缸鱼体总增重量；

脏体比（%）=100×试验末鱼体内脏重/试验末鱼体重。

1.3.6 数据分析

采用软件 GenEx 6.0.1 中 geNorm 算法，筛选内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *ACC*2 基因的相对表达量，结果采用平均值±标准差表示。采用 SPSS 17.0 软件统计分析，各组数据均通过了正态性和方差齐性检验，因此，组间差异采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间多重比较采用最小显著差数（LSD）检验，$P<0.05$ 表示差异显著。

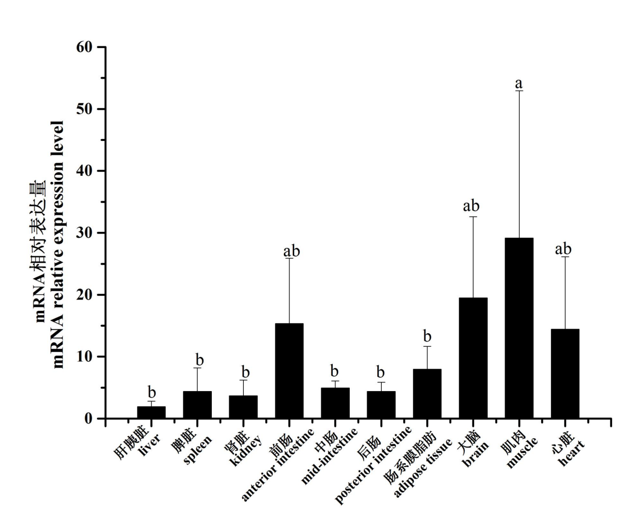
2 结果与分析

2.1 草鱼 *ACC*2 基因全长 cDNA 分子特征

草鱼 *ACC*2 基因 cDNA 全长 7 533 bp，含 1 个 7 149 bp 的开放阅读框，编码 2 382 个氨基酸，ACC2 蛋白计算分子质量为 268.34 ku，等电点为 6.13，命名为 ACCβ-1（GenBank 登录号：MF611923）。此外，由于可变剪接，还发现另外 1 个分子质量为 267.53 ku 的草鱼 ACC2 的同工型（isoforms），命名为 ACCβ-2（GenBank 登录号：MF611924），比 ACCβ-1 少 8 个氨基酸。

2.2 草鱼 *ACC*2 基因的组织表达

经筛选，以 *RPL*13*A* 和 *eEF*1*A* 基因组合为内参基因，采用 RT-qPCR 方法对草鱼 *ACC*2 基因在肝胰脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠、肠系膜脂肪、大脑、白肌和心脏等组织中的表达进行了研究。结果表明，*ACC*2 基因在所有检测组织中均有表达，*ACC*2 mRNA 的相对表达量在肌肉中最高，为 29.13；在大脑、前肠和心脏中次之，分别为 19.45、15.33 和 14.40；在肝胰脏中最低，仅为 1.90。肌肉中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量与大脑、前肠和心脏差异不显著（$P>0.05$），但显著高于其他组织（$P<0.05$，图 1）



数据柱上标注不同字母表示差异显著（P<0.05）。下图同。

Value columns with different letters mean significant difference (P<0.05). The same as below.

图 1 草鱼 *ACC*2 基因在不同组织中的表达分析

Fig.1 Expression analysis of *ACC*2 gene in different tissues of grass carp

2.3 不同脂肪源饲料对草鱼生长指标的影响

饲养试验结束后对草鱼的生长情况进行测量，计算增重率、饲料系数和脏体比等生长指标。由表 3 可以看出，鱼油组和豆油组增重率分别为 139.6%和 138.8%，显著高于猪油组（P<0.05），猪油组的增重率只有 128.8%，说明鱼油和豆油是草鱼良好的脂肪源，猪油组效果较差；鱼油组和豆油组的饲料系数分别为 1.14 和 1.17，显著低于猪油组（P<0.05），表明猪油不适合单独作为草鱼的脂肪源。

表 3 不同脂肪源饲料对草鱼生长指标的影响

Table 3 Effects of different dietary lipid sources on growth indexes of grass carp

组别 Groups	初重 Initial weight/g	末重 Final weight/g	脏体比 Visceral somatic index/%	增重率 Weight gain rate/%	饲料系数 Feed coefficient
鱼油 Fish oil	56.40±1.80	135.10±0.10^{a}	8.74±0.57	139.60±0.10^{a}	1.14±0.01^{a}
猪油 Lard oil	56.40±1.80	129.00±0.70^{b}	8.22±0.17	128.80±1.20^{b}	1.24±0.01^{b}
豆油 Soybean oil	56.40±1.80	133.00±1.00^{a}	8.89±0.50	138.80±1.70^{a}	1.17±0.02^{a}

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

In the same column, values with different letter superscripts mean significant difference (P<0.05)

2.4 不同脂肪源饲料和饥饿再投喂对草鱼 *ACC*2 基因表达的影响

将 6 个内参基因分别和不同脂肪源饲料组以及饥饿再投喂后 *ACC*2 的 Ct 值和扩增效率输入软件，最后软件自动筛选，*RPL*13*A* 和 *GAPDH*2 为不同脂肪源肝胰脏及肌肉中基因表达的内参基因，*ACTB* 和 *GAPDH*1 为饥饿再投喂基因表达的内参基因。结果显示，投喂不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏及肌肉中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量均无显著影响（P>0.05，图 2）；饥饿再投喂后，草鱼肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量在投喂后 12 h 时显著升高（P<0.05），且达到高峰值 6.17，之后出现显著下降（P<0.05），24 h 时仅为 2.84（图 3）

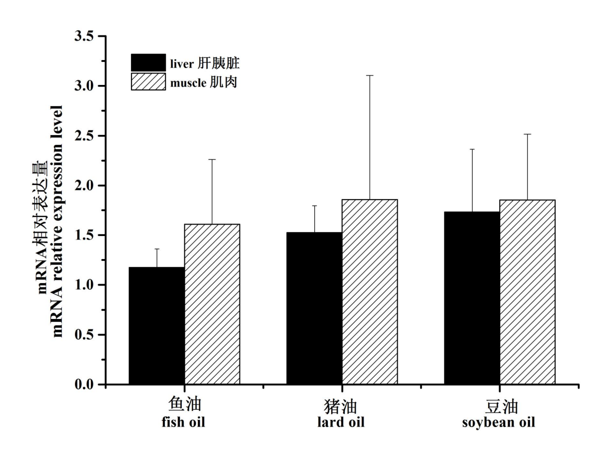


图 2　投喂不同脂肪源饲料的草鱼肝胰脏和肌肉中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量

Fig.2　Relative expression level of *ACC*2 mRNA in hepatopancreas and muscle of grass carp fed diets with different lipid sources

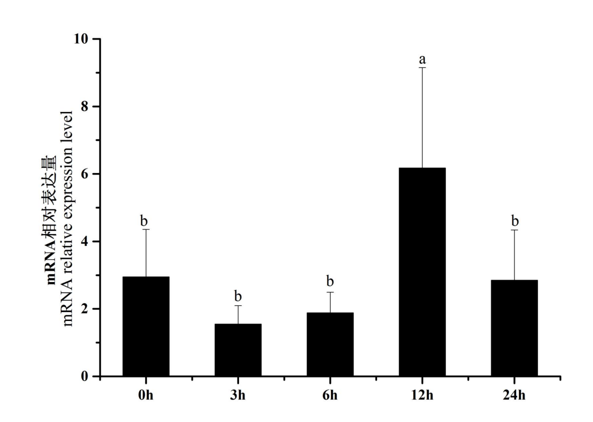


图 3　饥饿再投喂后草鱼肝胰脏 *ACC*2 mRNA 的相对表达量

Fig.3　Relative expression level of *ACC*2 mRNA in hepatopancreas of grass carp after starvation and refeeding

3　讨　论

3.1　草鱼 ACC2 蛋白结构

对草鱼 ACC2 氨基酸功能性结构域进行了分析，其结果见图 4。

由图 4 可知，草鱼 ACC2 由 1 个基因编码，具有 3 个结构域，分别为 BC、BCCP 和 CT，它们组成 ACC2 的 3 个亚基。甘氨酸富集区（GGGGKG）被认为是 ATP 的结合域[11]，草鱼 ACC2 的 BC 域包含一个 ATP 结合位点是 Gly$^{371\sim376}$，与草鱼[10]ACC1、半滑舌鳎[12]和人类[7,13]ATP 结合域完全相同，说明这段序列高度保守。保守的 Met-Lys-Met 序列被认为是生物素结合位点[14]。草鱼 ACC2 的 BCCP 域有 2 个 4 肽序列 Val-Met-Lys-Met 和 Arg-Met-Lys-Met 分别位于氨基酸残基的第 840～843 位点和第 1 698～1 701 位点。相关研究表明生物素会上调 *ACC*2 基因在下丘脑的表达，对小鼠给予过量生物素会抑制其食物摄入量[15]。

BC　BCCP　ACC2 central region　CT

563　670　808　874　875　1612　1704　2258

BC：生物素羧化酶 biotin carboxylase；BCCP：生物素羧基载体蛋白 biotin carboxyl carrier protein；CT：羧基转移酶 carboxyltransferase；ACC2 central region:ACC2 中心区域。

图 4　草鱼 ACC2 蛋白的 3 个结构域

Fig.4　Three domains of ACC2 protein in grass carp

3.2　草鱼 *ACC2* 基因的组织表达

草鱼 *ACC2* 基因在检测的 10 种组织中均有表达，其中肌肉中相对表达量最高，肝胰脏中相对表达量最低，白肌中的相对表达量是肝胰脏中的 15.3 倍（图 1）。据 Abu-Elheiga 等[7]报道，*ACC2* 基因主要在人的心脏和骨骼肌有较高的表达量。而相关研究也表明，大鼠 *ACC2* 主要在骨骼肌和心脏等氧化组织中表达[4]。上述研究结果与本试验类似，说明草鱼与其他哺乳动物一样，其 *ACC2* 基因主要是在肌肉中表达。由于 ACC2 的产物 MA 是 CPT-Ⅰ的有效抑制剂，*ACC2* 基因缺陷的哺乳动物其心脏和骨骼肌中 MA 的水平明显下降，其他的研究也证实 ACC2 的活性决定心脏中 MA 的水平，进一步说明 *ACC2* 基因可以调控骨骼肌和心脏中脂肪酸的氧化[16-17]。

3.3　不同脂肪源饲料对草鱼生长指标的影响

本试验中，各组草鱼脏体比差异不显著，可能是由于饲料脂肪水平较低引起的；鱼油组及豆油组的增重率显著高于猪油组，饲料系数则是猪油组显著高于鱼油组和豆油组，说明鱼油和豆油的促生长效果较好且两者无显著差异，它们是草鱼良好的脂肪源，猪油不适合单独作为草鱼的脂肪源。Zhang 等[18]研究发现，以鱼油、豆油和棕榈油为脂肪源分别饲养牛蛙，它们的增重率均较高且三者间无显著差异，但均显著高于以家禽脂肪和猪油为脂肪源的牛蛙。陈涛等[19]在饲料中分别添加 4%猪油、4%豆油、4%豆油-鱼油混合物和 4%鱼油为脂肪源饲喂红罗非鱼稚鱼 60 d，结果发现，豆油组和豆油+鱼油混合物组红罗非鱼稚鱼的末均体重和增重率显著高于猪油组，猪油组饲料系数显著高于其他 3 组，豆油组鱼体的生长性能最好，肝体比在各组间无显著性差异，由此表明豆油是红罗非鱼稚鱼良好的脂肪源。成永旭等[20]分别采用豆油和猪油作为草鱼脂肪源，结果发现猪油组草鱼肝胰脏和肌肉中脂肪含量最高，肠系膜脂肪积累也最多，且肝胰脏的形态已有脂肪肝病变倾向，而豆油组草鱼肝胰脏形态正常，说明以豆油为草鱼脂肪源优于猪油。刘玮等[21]分别以鱼肝油、豆油、菜油、猪油和混合油为脂肪源配制饲料饲喂草鱼，结果发现混合油组及鱼肝油组草鱼生长效果最好，相对增重率和饲料系数最低，豆油组及猪油组的生长状况次之，上述研究与本试验结果基本一致。

3.4　不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏和肌肉中及饥饿再投喂对草鱼肝胰脏中 *ACC2* 基因表达的影响

本试验以鱼油、豆油和猪油为脂肪源，饲养草鱼 12 周，探究 *ACC2* 基因在草鱼肝胰脏和肌肉中的表达变化，结果发现，各组草鱼肝胰脏及肌肉 *ACC2* mRNA 的相对表达量均无显著差异（图 2），说明 *ACC2* 在草鱼体内表达是相对稳定的，不受饲料脂肪种类的影响。到目前为止，分析鱼类在投喂不同脂肪源饲料后体内 *ACC2* mRNA 相对表达量变化的研究相对较少。据 Olson 等[22]研究发现，敲除小鼠骨骼肌中 *ACC2* 基因后对其体重、食物摄入量以及体组成没有产生显著影响，同时发现小鼠骨骼肌中丙二酰辅酶 A 总量和脂肪酸氧化率也没有发生显著变化，这说明小鼠体内发生了代谢补偿，*ACC2* 基因缺失对能量平衡的影响较小。对雄性大鼠的研究发现其骨骼肌脂肪酸氧化与 *ACC2* 基因的磷酸化没有直接的相关性[23]。Torstensen 等[24]以毛鳞鱼油、棕榈油、葵花籽油和混合油（毛鳞鱼油：葵花籽油=1:1）为脂肪源饲喂大西洋鲑，发现不同脂

肪源饲料对鲑鱼肌肉和肝脏中脂肪酸β氧化及鲑鱼的生长没有产生显著影响，从侧面验证了本试验中不同脂肪源饲料对草鱼肌肉中 *ACC*2 基因表达无显著影响的结果。本实验室前期研究发现，饲喂不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏中 *ACC*1 基因表达也无显著影响[10]。

本研究中，在饥饿再投喂 12 h 后草鱼肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量显著增加，喂食 24 h 后 *ACC*2 mRNA 的的相对表达量又显著下降（图 3）。Oh 等[25]研究发现大鼠肝脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量在喂食后 12 h 时出现显著增加，再投喂 24 h 后也显著增加，这些结果说明大鼠 *ACC*2 基因的表达在转录水平受调控。上述研究与本试验结果存在部分差异，可能是由于物种不同造成的。据 Ryu 等[26]报道，饥饿再投喂高脂饲粮后小鼠肝脏中 *ACC*1 mRNA 的相对表达量显著升高。相关研究也发现鸡在饥饿再投喂 2 h 后，其肝脏中 *ACC*1 和脂肪酸合成酶基因 mRNA 的相对表达量显著上升，而与脂肪酸氧化相关基因 *CPT*-Ⅰ mRNA 的相对表达量显著下降[27]，而本试验中草鱼肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量在饥饿再投喂 0～6 h 内无显著差异，说明在此期间草鱼肝胰脏中脂肪酸的合成占主导地位。

4 结 论

① 本试验从草鱼肝胰脏和心脏混合组织中克隆出了 *ACC*2 基因全长 cDNA，主要的功能位点 ATP 结合位点、生物素结合位点与其他脊椎动物相比基本保守。

② 草鱼 *ACC*2 基因主要在肌肉等脂肪分解活跃的组织中表达。

③ 投喂不同脂肪源饲料对草鱼肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量无显著影响。

④ 饥饿再投喂后，肝胰脏中 *ACC*2 mRNA 的相对表达量在投喂 12 h 后最高。

参考文献：

[1] ABU-ELHEIGA L,BRINKEY W R,ZHONG L,et al.The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2000,97(4):1444–1449.

[2] HARDIE D G,PAN D A.Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase[J].Biochemical Society Transactions,2002,30(6):1064–1070.

[3] BARBER M C,PRICE N T,TRAVERS M T.Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa[J].Biochimica et Biophysica Acta：Molecular & Cell Biology of Lipids,2005,1733(1):1–28.

[4] KREUZ S,SCHOELCH C,THOMAS L,et al.Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes[J].Diabetes/Metabolism Research and Reviews,2009,25(6):577–586.

[5] LOPEZ-CASILLAS F,BAI D H,LUO X C,et al.Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme A carboxylase[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1988,85(16):5784–5788.

[6] MAO J Q,MARCOS S,DAVIS S K,et al.Genomic distribution of three promoters of the bovine gene encoding acetyl-CoA carboxylase alpha and evidence that the nutritionally regulated promoter I contains a repressive element different from that in rat[J].The Biochemical Journal,2001,358(1):127–135.

[7] ABU-ELHEIGA L,ALMARZAl-ORTEGA D B,BALDINI A,et al.Human acetyl-CoA carboxylase 2.Molecular cloning,characterization,chromosomal mapping,and evidence for two isoforms[J].Journal of

Biological Chemistry,1997,272(16):10669–10677.
[8] ABU-ELHEIGA L,MATZUK M M,ABO-HASHEMA K A,et al.Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2[J].Science,2001,291(5513):2613–2616.
[9] KIM K W,YAMANE H,ZONDLO J,et al.Expression,purification,and characterization of human acetyl-CoA carboxylase 2[J].Protein Expression and Purification,2007,53(1):16–23.
[10] CHENG H L,JI N J,PENG Y X,et al.Molecular characterization and tissue-specific expression of the acetyl-CoA carboxylase alpha gene from Grass carp,*Ctenopharyngodon idella*[J].Gene,2011,487(1):46–51.
[11] KONDO H,SHIRATSUCHI K,YOSHIMOTO T,et al.Acetyl-CoA carboxylase from Escherichia coli:gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1991,88(21):9730–9733.
[12] 张夏青,许建和,潘茜,等.半滑舌鳎乙酰辅酶 A 羧化酶α基因全长 cDNA 分子克隆及饲料脂肪水平对其在肝脏中表达的影响[J].动物营养学报,2016,28(2):485–497.
[13] ABU-ELHEIGA L,JAYAKUMAR A,BALDINI A,et al.Human acetyl-CoA carboxylase:characterization,molecular cloning,and evidence for two isoforms[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1995,92(9):4011–4015.
[14] TAKAI T,WADA K,TANABE T.Primary structure of the biotin-binding site of chicken liver acetyl-CoA carboxylase[J].FEBS Letters,1987,212(1):98–102.
[15] SONE H,KAMIYAMA S,HIGUCHI M,et al.Biotin augments acetyl CoA carboxylase 2 gene expression in the hypothalamus,leading to the suppression of food intake in mice[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2016,476(3):134–139.
[16] RESZKO A E,KASUMOV T,DAVID F,et al.Regulation of malonyl-CoA concentration and turnover in the normal heart[J].Journal of Biological Chemistry,2004,279(33):34298–34301.
[17] TONG L.Acetyl-coenzyme A carboxylase:crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery [J].Cellular and Molecular Life Sciences,2005,62(16):1784–1803.
[18] ZHANG C X,HUANG K K,LU K L,et al.Effects of different lipid sources on growth performance,body composition and lipid metabolism of bullfrog *Lithobates catesbeiana*[J].Aquaculture,2016,457:104–108.
[19] 陈涛,杨艳,卢航,等.不同脂肪源对红罗非鱼稚鱼生长及肌肉脂肪酸组成的影响[J].饲料工业,2017,38(4):29–35.
[20] 成永旭,王联合,陈居明.饲料中不同脂肪源对草鱼生长及其肌肉和肝脏脂肪含量的影响[J].水产科技情报,1995(4):171–172.
[21] 刘玮,徐萍,任本根,等.不同脂肪源饲料对草鱼稚鱼生长的影响[J].水产学报,1995,19(4):362–365.
[22] OLSON D P,PULINILKUNNIL T,CLINE G W,et al.Gene knockout of Acc2 has little effect on body weight,fat mass,or food intake[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2010,107(16):7598–7603.
[23] ALKHATEEB H,HOLLOWAY G P,BONEN A.Skeletal muscle fatty acid oxidation is not directly associated

with AMPK or ACC2 phosphorylation[J].Applied Physiology,Nutrition,and Metabolism,2011,36(3):361–367.

[24] TORSTENSEN B E,LIE Ø,FRØYLAND L.Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—effects of capelin oil,palm oil,and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources[J].Lipids,2000,35(6):653–664.

[25] OH S Y,PARK S K,KIM J W,et al.Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver[J].The Journal of Biological Chemistry,2003,278(31):28410–28417.

[26] RYU M H,SOHN H S,HEO Y R,et al.Differential regulation of hepatic gene expression by starvation versus refeeding following a high-sucrose or high-fat diet[J].Nutrition,2005,21(4):543–552.

[27] SANEYASU T,SHIRAGAKI M,KURACHI K,et al.Effects of short-term refeeding on the expression of genes involved in lipid metabolism in chicks (*Gallus gallus*)[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part B,Biochemistry and Molecular Biology,2013,166(1):1–6.

Molecular Cloning of Acetyl-CoA Carboxylase β Full-Length cDNA from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Expression Analysis

YAN Yuan[1] CHENG Hanliang[1*] XU Jianhe[1] HAN Zheng[1] YI Lefei[1] SHEN Xin[1] DING Zhujing[1]

(*Huaihai Institute of Technology*, *College of marine life and Fisheries*, *Lianyungang*, 222005, *China)*

Abstract: The full-length cDNA of acetyl-CoA carboxylase β (*ACC*2) gene was cloned from grass carp by reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. The expression of *ACC*2 gene in the hepatopancreas, spleen, brain, anterior intestine, mid-intestine, posterior intestine, kidney, muscle, heart and adipose tissues of grass carp was analyzed by quantitative real-time PCR method. Meanwhile, the *ACC*2 gene expression in the hepatopancreas and muscle of grass carp fed with diets containing different lipid sources for 12 weeks was studied. In addition, *ACC*2 gene expression in the hepatopancreas of grass carp at 3, 6, 12 and 24 h starvation and refeeding was also investigated. The results showed that the full-length cDNA of *ACC*2 gene was 7 533 bp with a 7 149 bp open reading frame encoding 2 382 amino acids. The calculated molecular weight of ACC2 protein was 268.34 ku and the isoelectric point was 6.13. In addition, alternative splicing was observed in *ACC*2 gene of grass carp and one isoform was formed, where eight amino acids were absent compared with that of the 268.34 ku ACC2 protein. The expression of *ACC*2 gene was detected in all examined tissues. The highest expression level of *ACC*2 mRNA was found in the muscle (29.13), which was significantly higher than that in other tissues except for brain, anterior intestine and heart (P<0.05), whereas its expression in the hepatopancreas (only 1.90) was the lowest. There were no significant differences in *ACC*2 mRNA expression level in the hepatopancreas and muscle of grass carp after fed with diets containing different lipid sources (P>0.05). The highest expression level of *ACC*2 mRNA (6.17) in the hepatopancreas of grass carp was detected in the group of 12 h starvation and

*Corresponding author, professor, E-mail: CHL3139@163.com （责任编辑 菅景颖）

refeeding ($P<0.05$), which then decreased obviously and declined to 2.84 in the group of 24 h starvation and refeeding. In summary, we have cloned the full-length cDNA of *ACC*2 gene from grass carp. Compared with other vertebrates, the main functional sites (ATP-binding site and biotin-binding site) are basically conserved. The active lipolysis tissues, such as muscle, are the main *ACC*2 gene expressing tissues in grass carp. Moreover, the hepatopancreas *ACC*2 mRNA expression level is not affected after the grass carp fed with diets containing different lipid sources, and the highest expression level of *ACC*2 mRNA in the hepatopancreas of grass carp is detected when 12 h starvation and refeeding.

Key words: grass carp; acetyl-CoA carboxylase β; molecular cloning; gene expression